

DE 10 51 00 40  
**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

Rec'd PCT 01 OCT 2004

10/510040



Handwritten signature/initials

REC'D 17 JUN 2003	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:**

102 14 983.6

**Anmeldetag:**

04. April 2002

**Anmelder/Inhaber:**

TransMIT Gesellschaft für Technologietransfer mbH,  
Giessen/DE

**Bezeichnung:**

Vernebelbare Liposomen und ihre Verwendung zur  
pulmonalen Applikation von Wirkstoffen

**IPC:**

A 61 K 9/127

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 9. Mai 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Handwritten signature

Wehner

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

A 9161  
03/00  
EDV-L

**BEST AVAILABLE COPY**



## Patentanmeldung

Erfinder:

Dr. Thomas Schmehl  
5 Liebigstraße 23  
35390 Giessen

Dr. Tobias Gessler  
Kirchstraße 15  
10 35435 Wettenberg

Esther Waschkowitz  
Johann-Sebastian-Bach-Straße 5  
35392 Giessen  
15

20 Vernebelbare Liposomen und ihre Verwendung zur pulmonalen Ap-  
plikation von Wirkstoffen

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von Lipo-  
somen, die stabil gegenüber Vernebelung und zur pulmonalen  
25 Applikation geeignet sind und die eine verzögerte Freisetzung  
von eingeschlossenen Wirkstoffen zeigen.

An.119/Wa/Ges/Schm

### Beschreibung

In der pharmazeutischen Technologie unterscheidet man verschiedene Arzneiformen mit protrahierter Wirkung. Sie alle haben das Ziel, eine Wirkungsverlängerung des jeweiligen Arzneistoffes zu erreichen. Man unterscheidet Langzeit-, Depot- und Retardpräparate. Die modifizierte Wirkstofffreigabe kann durch chemische Veränderungen (z.B. Salze, Ester, Komplexe), durch Zusätze (z.B. Verwendung von Hilfsstoffen), durch technologische Maßnahmen (z.B. Wahl bestimmter Korngrößen, Tablettenhärten) sowie durch Wahl des Applikationsortes oder der Applikationsart erreicht werden. In Abhängigkeit von der Art der Freigabe unterscheidet man den sustained-, repeat-prolonged-, und delayed-release-Typ.

Ein besonderes Problem stellt die Applikation von pharmazeutischen Wirkstoffen in der Lunge dar, da hier aus Verträglichkeitsgründen die Auswahl der Hilfsstoffe stark eingeschränkt und eine gezielte und kontrollierte Freisetzung schwierig zu erreichen ist.

Als toxikologisch unbedenklich gelten Liposomen, wie die bereits für andere Applikationswege zugelassenen liposomalen Produkte Daunoxome®, Ambisome®, HeparinPur® u.a. zeigen. Liposomale Formulierungen erscheinen auch für die Lunge als geeignet, da sie ganz oder zum größten Teil aus körpereigenen Substanzen hergestellt werden können, die natürlicherweise in der Lunge vorkommen.

An.119/Wa/Ges/Schm

Als Liposomen bezeichnet der Fachmann Lipidvesikel, die in ihrer Struktur körpereigenen Zellmembranen stark ähneln. Die Vesikelwände, die beispielsweise aus Phospholipiden bestehen, trennen einen wässrigen Innenraum von der ebenfalls wässrigen umgebenden Phase. Derartige Lipidvesikel können sich spontan nach thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten u.a. durch Dispersi-  
5 on von Phospholipiden in überschüssigem wässrigem Medium bilden. Zur Herstellung von Liposomen werden üblicherweise natürliche, partialsynthetische oder auch vollsynthetische  
10 Phospholipide eingesetzt. Während andere Lipide einen kegelförmigen Molekülaufbau zeigen, der die Bildung von Mizellen favorisiert, weisen Phospholipide aufgrund der beiden Fettsäureketten eine zylindrische Geometrie auf, die in wässrigem Medium die Bildung von lamellaren Strukturen begünstigt.

15 Der Aufbau der einzelnen Lamellen eines Liposoms ist ähnlich dem der Zellmembran: Die Phospholipide bilden Doppelschichten, in denen sich die hydrophoben Molekülteile im Inneren der Doppelschicht befinden, während die hydrophilen Kopfgruppen in die wässrige Phase nach außen beziehungsweise innen  
20 zeigen.

Aufgrund ihrer Struktur und Größe lassen sich die Liposomen in verschiedene Gruppen einteilen (Tabelle 1).

25

An.119/Wa/Ges/Schm

4/28

Tabelle 1

Klassifizierung	Durchmesser	Struktur
MLV (multilamellar vesicles)	100-5000 nm	mehrere Doppelmembranen
SUV (small unilamellar vesicles)	< 100 nm	unilamellare, kleine, hydrophil gefüllte Vesikel
LUV (large unilamellar vesicles)	> 100 nm (bis 2000 nm)	unilamellare, große, hydrophil gefüllte Vesikel

Da Liposomen sowohl hydrophile als auch lipophile Bereiche aufweisen, können Wirkstoffe unterschiedlich eingebaut werden. Während sich lipophile Wirkstoffe in die Membran einlagern, befinden sich hydrophile Stoffe in den wässrigen Schichten der Vesikelwände oder im von den Vesikelwänden begrenzten wässrigen Innenraum der Liposomen. Amphiphile Wirkstoffe ordnen sich analog den Phospholipiden an. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Liposomenklassen bestimmen die möglichen Einsatzgebiete. So weisen SUV im Verhältnis einen hohen Anteil an Lipiden auf und eignen sich von daher vor allem für lipophile Wirkstoffe; für LUV gilt das Gegenteil, sie weisen einen verhältnismäßig großen Innenraum zur Aufnahme hydrophiler Wirkstoffe auf. Eine verzögerte Freisetzung ist am ehesten durch eine MLV-Struktur mit den vielen hintereinander geschalteten Diffusionsmembranen realisierbar.

Sowohl durch ihre biologische Verträglichkeit als auch durch die Möglichkeit einer modifizierbaren Pharmakokinetik (z.B. verzögerte Wirkstofffreisetzung) stellen Liposomen einen

An.119/Wa/Ges/Schm

5/28

vielversprechenden Ansatz für eine kontrollierte und verzögerte Freisetzung von Wirkstoffen in der Lunge dar.

Eine derartige kontrollierte und verzögerte Freisetzung von Wirkstoffen in der Lunge könnte für eine Vielzahl von Erkrank-

5 kungen von erheblicher therapeutischer Bedeutung sein. Insbesondere bietet sich bei Lungenerkrankungen die Möglichkeit,

Wirkstoffe direkt in das Zielorgan zu verbringen und dort eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration bei langer Wirkdauer zu erzielen. Die retardierte Wirkstofffreisetzung kann darüber

10 hinaus zu einer Verminderung von Nebenwirkungen führen, da

zum einen starke Konzentrationsschwankungen mit hohen Konzentrations-Peaks unmittelbar nach der Applikation vermieden werden, zum anderen durch die liposomale Verpackung Wirkstoffe mit kurzer biologischer Halbwertszeit Verwendung finden

15 können, die nach Freisetzung und Wirkungsvermittlung schnell inaktiviert werden. In Gegensatz dazu können Wirkstoffe mit

langer biologischer Halbwertszeit, wie sie teilweise zur Behandlung des Asthmas oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen (COPD) eingesetzt werden, über die Luft-Blut-

20 Barriere in den Körperkreislauf gelangen und dort zu Nebenwirkungen führen. Neben den bereits erwähnten Lungen- und

Atemwegserkrankungen Asthma und COPD stellen insbesondere die Lungenentzündung und der Lungenhochdruck Erkrankungen dar, die durch liposomal verpackte Wirkstoffe besser behandelt

25 werden könnten. So sind beispielsweise derzeit in der Therapie des Lungenhochdrucks mit gefäßaktiven Substanzen (z.B.

Prostazyklin oder Prostazyklinanaloga) aufgrund deren kurzen

An.119/Wa/Ges/Schm

6/28

biologischen Halbwertszeiten häufige, zum Teil stündliche Inhalationen mit einer Dauer von bis zu 15 Minuten für eine effektive und anhaltende Drucksenkung im Lungenkreislauf notwendig. Liposomale Verpackung und retardierte Freisetzung der Substanzen könnten die Inhalationshäufigkeit zum Wohle der Patienten drastisch reduzieren und gleichzeitig zu einer konstanten, auch über die Nachtphase anhaltenden, therapeutisch erwünschten Drucksenkung im Lungenkreislauf sorgen.

Neben der Anwendung bei Lungenerkrankungen ist die verzögerte und kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen auch für systemische Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, von Interesse. Die Lunge ist ein Organ, das aufgrund der äußerst dünnen Grenzschicht zwischen Luft und Blut und der großen Gesamtfläche der Lungenbläschen über ein hohes Resorptionsvermögen verfügt. Daher können transpulmonal applizierte Wirkstoffe systemisch verfügbar gemacht und entsprechend zur Prophylaxe oder Therapie von systemischen Erkrankungen eingesetzt werden. Beispielsweise wird derzeit die inhalative Bolusgabe von Insulin als Alternative zur Injektion entwickelt, wobei jedoch bisher keine Formulierung zur kontinuierlichen basalen Insulinfreisetzung in den Körperkreislauf bekannt ist.

Bislang gibt es keine Depotform zur pulmonalen Applikation. Die bisher einzige Möglichkeit für eine lange Wirkdauer besteht in der Verwendung von Arzneistoffen mit entsprechend langer Halbwertszeit.

An.119/Wa/Ges/Schm

7/28

Das Standardverfahren zum Einbringen von Wirkstoffen in die Lunge ist die Inhalation von Aerosolen. Wirkstofftragende Aerosole werden mittels geeigneter Aerosolgeneratoren erzeugt, in der Praxis übliche Geräte sind Düsen- und Ultraschallverneblung sowie Dosieraerosole und Pulverinhalatoren. Die Deposition von Aerosolen im Atemtrakt ist insbesondere abhängig von der Partikelgrößenverteilung des Aerosols. Partikel mit einem aerodynamischen Massendurchmesser von unter 6 µm erreichen zu einem größeren Prozentsatz die Lunge mit Luftröhre, Bronchien und Alveolarbereich; zu therapeutischen Zwecken sind entsprechend Aerosole mit Partikeldurchmessern kleiner 6 µm zu verwenden.

Wirkstoff-Formulierungen, die in wässriger Lösung vorliegen, lassen sich mit Düsen- oder Ultraschall-Aerosolgeneratoren vernebeln. Für die Anwendung mit Dosieraerosolen oder Pulverinhalatoren sind zusätzliche Modifikationen der Wirkstoff-Formulierungen notwendig (z.B. Lösung oder Suspension in Treibmitteln, Mikronisierung als Trockenpulver). Bei wässrigen liposomalen Dispersionen bietet sich in besonderer Weise die Düsen- und Ultraschallverneblung als Verfahren zur Aerosolerzeugung an. Beiden Verfahren gemeinsam ist, dass durch Einwirkung mechanischer Energie Aerosoltröpfchen aus dem Flüssigkeitskontinuum herausgelöst werden. Bei diesen Prozessen wirken Kräfte auf die zu vernebelnde Flüssigkeit und auf die suspendierten Lipidvesikel, die zu einer Beeinträchtigung der Integrität der Lipidvesikel und damit zu einer vorzeitigen Freisetzung des in die Vesikel eingeschlossenen Wirk-

An.119/Wa/Ges/Schm



stoffs führen können. Eine Grundvoraussetzung für die pulmonale Anwendbarkeit von liposomalen Depotformulierungen als Aerosol ist daher eine ausreichende Stabilität der Liposomen gegenüber dem Verneblungsprozess. Die Stabilität von Liposomen gegenüber der Verneblung hängt neben den technischen Bedingungen der verschiedenen Verneblungsprozesse (Druck, Ultraschallfrequenz) insbesondere von der Liposomenart und Liposomengröße sowie von der chemischen Zusammensetzung der Liposomenmembranen ab. Eine weitere Möglichkeit zum Einbringen von Wirkstoffen in die Lunge ist die intratracheale Instillation. Bei dieser Methode wird ein Schlauch in die Luftröhre oder in die tieferliegenden Bronchien eingeführt und die Wirkstofflösung über diesen in den Atemtrakt verbracht. Dieses Verfahren stellt zwar wesentlich geringere Anforderungen an die Stabilität von liposomalen Formulierungen als die Verneblung, führt jedoch zu einer inhomogenen Verteilung des eingebrachten Materials in der Lunge. Darüber hinaus ist die intratracheale Instillation aufgrund ihrer Invasivität nur äußerst begrenzt einsetzbar und eignet sich nicht für eine Heim- oder Dauertherapie. Um als pulmonale Depotform geeignet zu sein, muss eine liposomale Formulierung eine ausreichende Stabilität gegenüber dem Vernebelungsprozess besitzen, mittels Vernebelungstechniken in ein lungengängiges Aerosol überführt werden können, und eine verzögerte Wirkstofffreisetzung am Zielort aufweisen. Idealerweise beginnt die Freisetzung des Wirkstoffes direkt nach der Deposition der Liposomen in der Lunge und hält über mehrere Stunden an.

An.119/Wa/Ges/Schm

9/28

A

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine spezifische, nicht toxische Formulierung zur pulmonalen Applikation bereitzustellen, die vernebelbar und lungengängig ist und eine verzögerte Freisetzung von eingeschlossenen Wirkstoffen und/oder Farbstoffen nach der Deposition aufweist. Weiterhin ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem die Freisetzung von verkapseltem Wirk-/Farbstoff aus Liposomen gemessen werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Formulierungen spezifischer Liposomen-bildender, endogen in der Lunge vorkommender Lipide gelöst, teilweise unter dem Zusatz von synthetischen Tensiden wie Polyethylenglykol, oder dessen Derivaten. Darüber hinaus wird mit den Merkmalen des Anspruch 10 ein Verfahren zur Messung der Freisetzung von verkapseltem Wirk-/Farbstoff aus Liposomen vorgeschlagen.

Die liposomalen Formulierungen werden nach der dem Fachmann bekannten Filmmethode hergestellt (siehe beispielsweise das Lehrbuch von R. R. C. New (Editor), Liposomes: a practical approach, Oxford University Press, Reprint 1994). Als weiterer Arbeitsschritt erfolgt die Extrusion der Liposomen durch Filtermembranen sowie das Abtrennen des nichtverkapselten, freien Wirkstoffanteils durch Zentrifugation, Dialyse oder chromatographische Verfahren.

Zur Bestimmung der Effizienz der Einschlußreaktion können die Liposomen mit Methanol zerstört und anschließend die Konzentration des Wirkstoffs mittels geeigneter Methoden gemessen

An.119/Wa/Ges/Schm

10/28

werden. Zur Charakterisierung der Stabilität der Liposomen gegenüber der Verneblung wird die Liposomendispersion mittels gängiger Aerosolgeneratoren vernebelt, das entstehende Aerosol aufgefangen und anschließend der freie und der verkapselte Anteil des Wirkstoffs bestimmt.

Die Liposomen sind überraschenderweise gut mit gängigen Düsen- und Ultraschallverneblern aerosolierbar. Beim Vernebeln der liposomalen Dispersionen findet man vergleichbare Partikelgrößenverteilungen des entstehenden Aerosols wie beim Vernebeln von isotonischer Kochsalzlösung, so dass mit geeigneten handelsüblichen Verneblern lungengängige Aerosole aus den Liposomendispersionen erzeugt werden können. (Beispiele für handelsübliche Vernebler: Düsenvernebler wie Bennett-Raindrop®, Pari LC®, Pari LL®, Ventstream®, Ultraschallvernebler wie Multisonic pro®, Pulmosonic®, System LS®).

#### Ausführungsbeispiele:

Tabelle 2 zeigt die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen, die aus den natürlichen Bestandteilen des Lungensurfactant Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin (Chol), Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC), Sphingomyelin (SM) und dem nicht im Lungensurfactant vorkommenden Polyethylenglykol (PEG) kombiniert werden.

25

An.119/Wa/Ges/Schm

11/28

Tabelle 2

Liposomen- formulierungen	(DPFC)	(Chol)	(PEG)	(DMPC)	(SM)
Ausführungs- beispiel 1	7	3	0,15	-	-
	7	3	0,3	-	-
	7	3	0,6	-	-
Ausführungs- beispiel 2	7	4	-	1	-
	7	4	-	2	-
	7	4	-	3	-
	7	4	-	4	-
Ausführungs- beispiel 3	7	3	-	-	2%
	7	3	-	-	4%
	7	3	-	-	6%
	7	3	-	-	8%

Die Zahlen geben das molare Verhältnis der Komponenten DPFC, Chol, PEG und DMPC an; bei SM sind Gewichtsprozent angegeben.

## 5 Liposomenherstellung

Mit den erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen können hydrophile, lipophile und/oder amphiphile Wirk- oder Farbstoffe mit ausreichender Stabilität gegenüber der Verneblung verkapselt werden.

- 10 In den Ausführungsbeispielen wird als Modellwirkstoff Carboxyfluorescein verwendet, ein hydrophiler Farbstoff, der sich einfach mittels Fluoreszenzspektroskopie nachweisen läßt. Zur Herstellung der Carboxyfluorescein-Lösung (CF-Lösung) werden 100 mg 5-(6)-Carboxyfluorescein in 10 ml PBS-
- 15 Puffer gelöst und der pH-Wert der CF-Lösung auf 7,4 eingestellt. Zur Liposomenherstellung nach der Filmmethode wird 150 mg Gesamtmenge an Phospholipiden (siehe Formulierungen

An.119/Wa/Ges/Schm

12/28

Tabelle 2) in 40 ml eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (70:30 Volumenverhältnis) in einem Rundkolben gelöst und das Lösungsmittel bei 60°C im Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen. Der an der Innenwand des Kolbens entstehende dünne Film wird weiter 2h unter Vakuum getrocknet. Durch Zugabe von 10 ml der ebenfalls auf 60°C erwärmten CF-Lösung erfolgt die Hydratisierung des Filmes. Die entstandene Dispersion wird für 2h unter Erwärmung gerührt und vor der Extrusion einem Frier-Tau-Zyklus unterzogen. Dazu wird der Rundkolben in flüssigen Stickstoff getaucht bis der Inhalt gefroren ist. Während des Auftauens bei Raumtemperatur reißen die Membranen auf, schließen zusätzliches CF ein und erhöhen dadurch die Effizienz der Verkapselung. Dieser Zyklus wird fünfmal wiederholt. Danach wird die Dispersion erneut im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Jeweils 0,5 ml der Dispersion werden 21mal durch eine Polycarbonat-Filtermembran mit einem Porendurchmesser von 1,0 µm bzw. 0,4 µm extrudiert. Die Dispersion wird anschließend bei 4°C zentrifugiert (4 x 45 min/ 4500 rpm bzw. 4 x 60 min/ 15000 rpm). Die überstehende CF-Lösung wird jeweils nach den einzelnen Zentrifugationszyklen abpipettiert und durch ein gleiches Volumen an PBS-Puffer ersetzt.

#### Ausführungsbeispiel 1

Diese Liposomenformulierungen enthalten ein molares Verhältnis von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin (Chol) und Polyethylenglykol (PEG) von 7:3:0,15 bis 7:3:0,6.

An.119/Wa/Ges/Schm

13/28

**Ausführungsbeispiel 2**

Diese Liposomenformulierungen enthalten ein molares Verhältnis von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPFC), Cholesterin (Chol) und Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) von 7:4:1 bis 5 7:4:4.

**Ausführungsbeispiel 3**

Diese Liposomenformulierungen enthalten ein molares Verhältnis von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPFC) und Cholesterin 10 (Chol) von 7:3 als 100 Gewichtsprozent, dazu variierende Mengen an Sphingomyelin (SM) von mehr als 2%, besonders bevorzugt 2-8% Gewichtsprozent.

Ebenfalls vorteilhafte Eigenschaften haben Liposomenformulierungen mit Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPFC) und Cholesterin 15 (Chol) und Kombinationen von DMPC, SM und/oder PEG.

Die erfindungsgemäßen Liposomen haben eine Größe von 0,2 - 20 1,5 µm.

Tabelle 3 zeigt exemplarisch die Größe der Liposomen eines Herstellungsganges nach Extrusion durch eine Polycarbonatmembran mit 0,4 µm Porengröße, Zentrifugation und Verneblung mit 25 einem Düsenvernebler (dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen, n=3).

An.119/Wa/Ges/Schm

14/28

Tabelle 3

Formulierungen	Liposomen durchmesser nach Extrusion [µm]	Liposomen durchmesser nach Zentrifugation [µm]	Liposomen durchmesser nach Düsenverneblung [µm]
DPPC:Chol:DMPC 7:4:1 7:4:2 7:4:3 7:4:4	0,57 +/- 0,01	0,58 +/- 0,01	0,51 +/- 0,01
DPPC:Chol:PEG 7:3:0,15 7:3:0,3 7:3:0,6	0,60 +/- 0,02	0,57 +/- 0,01	0,64 +/- 0,01
DPPC:Chol:SM 7:3 mit 2% SM 7:3 mit 4% SM 7:3 mit 6% SM 7:3 mit 8% SM	0,65 +/- 0,01	0,68 +/- 0,02	0,70 +/- 0,01

#### Stabilität der Liposomen gegenüber Vernebelung

Zur Untersuchung der Stabilität gegenüber Vernebelung werden die durch eine 0,4 µm Polycarbonatfiltermembran extrudierten liposomalen Formulierungen mit PBS 1:10 verdünnt und jeweils 2,5 ml der erhaltenen Dispersion für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit Düsen- (betrieben mit 1 bar Druckluft) und Ultraschallverneblern (betrieben mit 10 l/min Zusatzluft) vernebelt. Das erzeugte Aerosol wird über einen Silikonschlauch (15 cm lang, 3 cm Innendurchmesser) auf eine Prallplatte aus Glas geleitet und in einem 40 ml Reagenzgefäß aufgefangen. Der freie und der gesamte Anteil an Carboxyfluorescein in den aufgefangenen Dispersionen wird fluoreszenzspektrometrisch analysiert.

An.119/Wa/Ges/Schm

15/28

Zur Bestimmung des freien Anteils an CF ( $C_{\text{frei}}$ ) werden 100 µl der erfindungsgemäßen liposomalen Dispersion in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert, 50 µl des erhaltenen Überstandes mit PBS-Puffer 1:100 verdünnt und die CF-Konzentration im Überstand fluoreszenzspektrometrisch quantifiziert. Zur Bestimmung des gesamten Anteils an CF ( $C_{\text{gesamt}}$ ) werden 50 µl der erfindungsgemäßen liposomalen Dispersion mit 450 µl Methanol versetzt, 10 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die Zugabe von Methanol bewirkt dabei die Zerstörung der Liposomen und eine vollständigen Freisetzung des Farbstoffes. Nach der Zentrifugation werden 50 µl des Überstands mit PBS 1:1000 verdünnt und die Konzentration von CF fluoreszenzspektrometrisch quantifiziert. Der in den Liposomen verkapselte Anteil des Farbstoffes ( $C_{\text{verkapselt}}$ ) läßt sich nun einfach anhand der folgenden Formel bestimmen:

$$C_{\text{verkapselt}} = (C_{\text{gesamt}} - C_{\text{frei}}) * 100 / C_{\text{gesamt}} \quad [\%]$$

Die Untersuchungen zur Stabilität der Liposomen gegenüber Verneblung zeigen, daß 50% - 80% der Liposomen den Verneblungsprozess mit Düsen- bzw. Ultraschallverneblern als intakte Liposomen überstehen.

Tabelle 4 zeigt exemplarisch die Stabilität der Liposomen gegenüber Düsenverneblung für ausgewählte Ausführungsbeispiele (Mittelwerte ± Standardabweichungen,  $n = 4$ ).

An.119/Wa/Ges/Schm.



16/28

Tabelle 4

Formulierungen	Anteil an liposomal verpacktem Wirkstoff nach Verneblung [%]
DPPC:Chol:DMPC 7:4:1 7:4:2 7:4:3 7:4:4	69,3 ± 1,3
DPPC:Chol:PEG 7:3:0,15 7:3:0,3 7:3:0,6	55,7 ± 1,8
DPPC:Chol:SM 7:3 mit 2% SM 7:3 mit 4% SM 7:3 mit 6% SM 7:3 mit 8% SM	76,9 ± 0,7

#### Freisetzungskinetik der liposomal verpackten Wirk- und Farbstoffe am Lungenmodell

- 5 Die erfindungsgemäßen liposomalen Dispersionen werden am Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge (Seeger et al., J Appl Physiol 1986, 61:1781-1789; Seeger et al., In: Oxygen Radicals in Biological Systems, edited by L. Packer. New York: Academic Press, 1994, vol. 233:549-10 584) untersucht. Dabei werden Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 2,5 und 3 kg mit Heparin antikoaguliert und mit einem Gemisch aus Xylocain, Ketamin, und Xylazin anaesthetisiert. Unter Beatmung mit Raumluft erfolgt eine Tracheostomie. Nach mittiger sternaler Thorakotomie wird ein Katheter in die Pul-15 monalarterie eingebunden, die Aorta ligiert und die beiden Ventrikel an der Herzspitze eröffnet.

An.119/Wa/Ges/Schm

17/28

Die Perfusion der Lunge erfolgt nun mittels einer Rollerpumpe, als Perfusionsmedium wird Krebs-Henseleit-Elektrolytlösung verwendet, die zusätzlich Hydroxyethylstärke und Natrium-Bicarbonat enthält. Parallel zu der künstlichen Perfusion wird die Lunge mit einem Gemisch aus 21% Sauerstoff, 5,3% Kohlendioxid und 73,7% Stickstoff beatmet. Das Herz-Lungen-Paket wird nun vorsichtig aus der Brusthöhle präpariert und anschließend ein zweiter Katheter im linken Ventrikel mittels einer Tabaksbeutelnaht fixiert. Nach Aufhängen der Lunge an einem Gewichtsmesser wird der venöse Schenkel des Perfusionssystems mit dem in das Herz eingebundenen Katheter verbunden, so dass ein geschlossener, rezirkulierender Perfusionskreislauf entsteht. Zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Temperatur wird das Perfusat auf 38°C geheizt und die frei hängende Lunge in eine beheizte Kammer verbracht.

Die Standardparameter der Lungenventilation und -perfusion sind:

- Die Lungenperfusion mittels Rollerpumpe beträgt 100 ml/min.
- Die Lungenventilation erfolgt mit einem Atemzugvolumen von 30 ml und einer Atemfrequenz von 30 min<sup>-1</sup>.
- Der positive endexpiratorische Druck (PEEP) beträgt 1 mmHg.
- Der linksventrikuläre Druck wird auf 2 mmHg eingestellt.
- Das Perfusatvolumen beträgt 150 ml.

An,119/Wa/Ges/Schm

18/28

Die inhalative Applikation von Aerosolen erfolgt über ein sog. Bag-in-Box-System (Abb. 1). Dieses System besteht aus einem Düsenvernebler (1), Vorratsbeutel (2), Ventilen (3) und einem flexiblen Ballon (4, Bag), der in ein luftdichtes Glasgefäß (5, Box) eingebracht ist. Die Beatmungspumpe (6) ist an das luftdichte Glasgefäß (5) angeschlossen und vermittelt je nach Richtung des Gasflusses einen Über- oder Unterdruck auf den im Glasgefäß (5) befindlichen flexiblen Ballon (4). Das vom Düsenvernebler (1) erzeugte Aerosol wird zunächst in den Vorratsbeutel (2) geleitet. Während der Expirationsphase der Pumpe (6) wird der flexible Ballon (4) aufgrund des Unterdrucks im Glasgefäß (5) gedehnt und über ein Ventilsystem (3) mit Aerosol aus dem Vorratsbeutel gefüllt. In der darauffolgenden Inspirationsphase wird das Aerosol bei entsprechender Ventilstellung aus dem Ballon (4) in den Atemtrakt der Lunge (7) verbracht.

Zur Verneblung wird ein Düsenvernebler (Bennett-Raindrop®) verwendet, der mit Atemgasgemisch (5,3% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub>, 73,7% N<sub>2</sub>) bei einem Druck von 1,0 bar betrieben wird.

20

Zur Bestimmung der Freisetzungskinetik von liposomal verkapseltem Farb- oder Wirkstoff werden in einer ersten Versuchsreihe an jeder Lunge zwei aufeinanderfolgende Interventionen durchgeführt. Zunächst erfolgt die inhalative Applikation einer definierten Menge an aerosolierter CF-Lösung über einen Zeitraum von 30 Minuten, gefolgt von einer Beobachtungszeit von 90 Minuten. Nach einem Perfusatwechsel mit 1 L frischer

An.119/Wa/Ges/Schm

19/28

Elektrolytlösung wird in einem zweiten Schritt die jeweilige liposmale Dispersion ebenfalls über 30 aerosoliert, gefolgt von einer Beobachtungszeit von bis zu 270 Minuten. Während beider inhalativen Aerosolapplikationen wird die gleiche Menge an CF in der Kaninchenlunge deponiert. Freies CF tritt bekanntermaßen schnell und vollständig aus dem Alveolarraum in das Gefäßsystem der Lunge über. Durch Probenentnahmen (0,5 ml) aus dem Perfusat, die beginnend mit dem Zeitpunkt unmittelbar vor der Aerosolapplikation alle 10 Minuten erfolgen, kann der Übertritt des Farbstoff quantifiziert werden. Im Vergleich mit der unverkapselten CF-Lösung läßt sich nun die Freisetzungskinetik des in Liposomen verkapselten CF beurteilen.

Die Freisetzungskinetik des Modell-Wirkstoffs CF für die erfindungsgemäßen Formulierungen ist in den Abbildungen 2-4 dargestellt (Abb.2 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/DMPC-Liposomen, Abb.3 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/PEG-Liposomen, Abb.4 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/SM-Liposomen).

Anzahl anhängende Zeichnungen: 4

25

An.119/Wa/Ges/Schm

20/28

**Abb. 1 Darstellung des Bag-in-Box-Systems zur Beatmung der isolierten Lunge**

Die Beatmungspumpe (6) bewegt einen flexiblen Ballon (4), der aus einem Vorratsbeutel (2) die Lunge (7) mit dem Aerosol/Atemgasgemisch versorgt. Die Füllung des Vorratsbeutels (2) erfolgt mit Aerosol, das mittels eines Düsenverneblers (1) erzeugt wird, der durch Atemgas mit 1,0 bar betrieben wird.

**Abb. 2 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/DMPC-Liposomen**

10 Liposomen der Zusammensetzung DPPC:Chol:DMPC = 7:4:1 mit Carboxyfluorescein als eingeschlossenem Modell-Wirkstoff werden über einen Zeitraum von 30 Minuten als Aerosol in eine isoliert ventilierte und perfundierte Kaninchenlunge eingebracht. Das aus den Liposomen freigesetzte und im Per-

15 fusionsmedium nachgewiesene Carboxyfluorescein ist in Prozent des gesamten initial in den Liposomen eingeschlossenen Carboxyfluoresceins angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus  $n = 3$  Versuchen.

DPPC = Dipalmitoylphosphatidylcholin, Chol = Cholesterin

20 DMPC = Dimyristoylphosphatidylcholin

**Abb. 3 Freisetzungskinetik von DPPC/Chol/PEG-Liposomen**

Liposomen der Zusammensetzung DPPC:Chol:PEG = 7:3:0.3 mit Carboxyfluorescein als eingeschlossenem Modell-Wirkstoff werden

25 den über einen Zeitraum von 30 Minuten als Aerosol in eine isoliert ventilierte und perfundierte Kaninchenlunge eingebracht.

An.119/Wa/Ges/Schm

21/28

Das aus den Liposomen freigesetzte und im Perfusionsmedium nachgewiesene Carboxyfluorescein ist in Prozent des gesamten initial in den Liposomen eingeschlossenen Carboxyfluoresceins angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus  $n = 3$  Versuchen.

DPPE = Dipalmitoylphosphatidylcholin, Chol = Cholesterin

PEG = Polyethylenglykol

#### Abb. 4 Freisetzungskinetik von DPPE/Chol/SM-Liposomen

Liposomen der Zusammensetzung DPPE:CHOL = 7:3 + 6% Sphingomyelin mit Carboxyfluorescein als eingeschlossenem Modell-Wirkstoff werden über einen Zeitraum von 30 Minuten als Aerosol in eine isoliert ventilierte und perfundierte Kaninchenlunge eingebracht. Das aus den Liposomen freigesetzte und im Perfusionsmedium nachgewiesene Carboxyfluorescein ist in Prozent des gesamten initial in den Liposomen eingeschlossenen Carboxyfluoresceins angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus  $n = 3$  Versuchen.

DPPE = Dipalmitoylphosphatidylcholin, Chol = Cholesterin

SM = Sphingomyelin

20

#### Bezugszeichenliste

- (1): Düsenvernebler
- (2): Vorratsbeutel
- (3): Ventile
- 25 (4): flexibler Ballon
- (5): Glasgefäß
- (6): Beatmungspumpe
- (7): Lunge

An.119/Wa/Ges/Schm

22/28

**Ansprüche**

1. Liposomen, dadurch gekennzeichnet dass sie Phospholipide, Cholesterin, synthetische Tenside, sowie Wirk- und/oder Farbstoff enthalten.
- 5 2. Liposomen, gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass sie als Phospholipide die Lungensurfactant-Phospholipide Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und/oder Sphingomyelin (SM) enthalten.
3. Liposomen, gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass  
10 sie als Phospholipide die Lungensurfactant-Phospholipide Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) und/oder Sphingomyelin (SM) enthalten und/oder als synthetisches Tensid Polyethylenglykol.
4. Liposomen, gemäss der Ansprüche 1 bis 3 enthaltend Dipal-  
15 mitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin und Polyethylenglykol (PEG), so dass ein molares Gesamtverhältnis von 7:3:0,15 bis 7:3:0,6 besteht.
5. Liposomen, gemäss der Ansprüche 1 bis 3 enthaltend Dipal-  
mitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin und Dimyri-  
20 stoylphosphatidylcholin (DMPC) so dass ein molares Gesamtverhältnis von 7:4:1 bis 7:4:4 besteht.
6. Liposomen, gemäss der Ansprüche 1 bis 3 enthaltend Dipal-  
mitoylphosphatidylcholin (DPPC), Cholesterin und Sphin-  
gomyelin (SM) so dass ein molares Verhältnis von DPPC zu  
25 Cholesterin von 7:3 mit zusätzlich 2 bis 8 Gewichtsprozent Sphingomyelin (SM) besteht.

An.119/Wa/Ges/Schm

7. Liposomen, gemäss Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet dass sie hydrophile, lipophile und/oder amphiphile Wirk- oder Farbstoffe enthalten.
8. Liposomen gemäss der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Partikelgröße von 0,2 - 1,5 µm aufweisen; so daß sie mit Düsen- und Ultraschallverneblern vernebelbar und alveolargängig sind und zur Behandlung des Alveolarraumes, der großen und kleinen Bronchien und der Trachea eingesetzt werden können.
9. Verwendung von Liposomen nach Anspruch 1 bis 8 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Prävention, Diagnose und/oder Behandlung von Lungenerkrankungen und systemischen Erkrankungen.
10. Verfahren zur Messung der Freisetzung von verkapseltem Wirk-/Farbstoff aus Liposomen, gekennzeichnet durch die Schritte
- Präparation der isoliert perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge
  - Verneblung der Liposomen mit einem Vernebler- und Beatmungssystem
  - Bestimmung der Farb- und/oder Wirkstoffkonzentration im Perfusat und/oder Homogenisat der Kaninchenlunge.

An.119/Wa/Ges/Schm

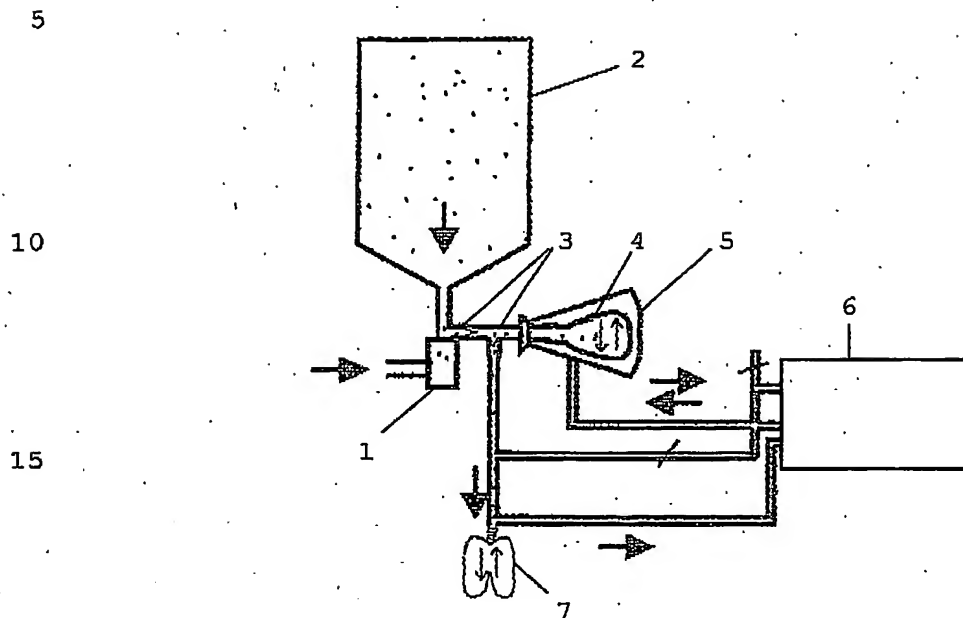


### Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von spezifischen Liposomen zur pulmonalen Applikation von Arzneistoffen. Die aus den Stoffen DPPC und Cholesterin im molaren Verhältnis von 7:3 bzw. 7:4 formulierten Liposomen werden durch nicht-toxische Zusätze wie Sphingomyelin, Dimyristoylphosphatidylcholin und/oder Polyethylenglykol ergänzt, sind stabil gegenüber Vernebelung mit handelsüblichen Verneblern und weisen gleichzeitig eine verzögerte Freisetzungskinetik des Wirkstoffes auf.

An.119/Wa/Ges/Schm

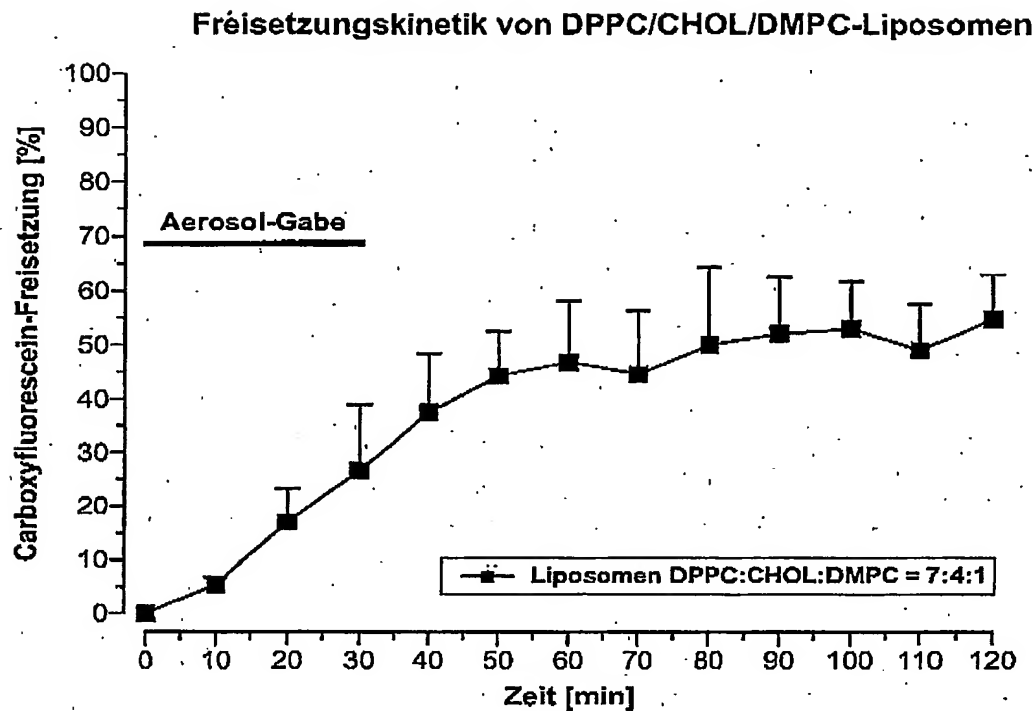
Abb. 1



An.119/Wa/Ges/Schm

26/28

Abb. 2



5

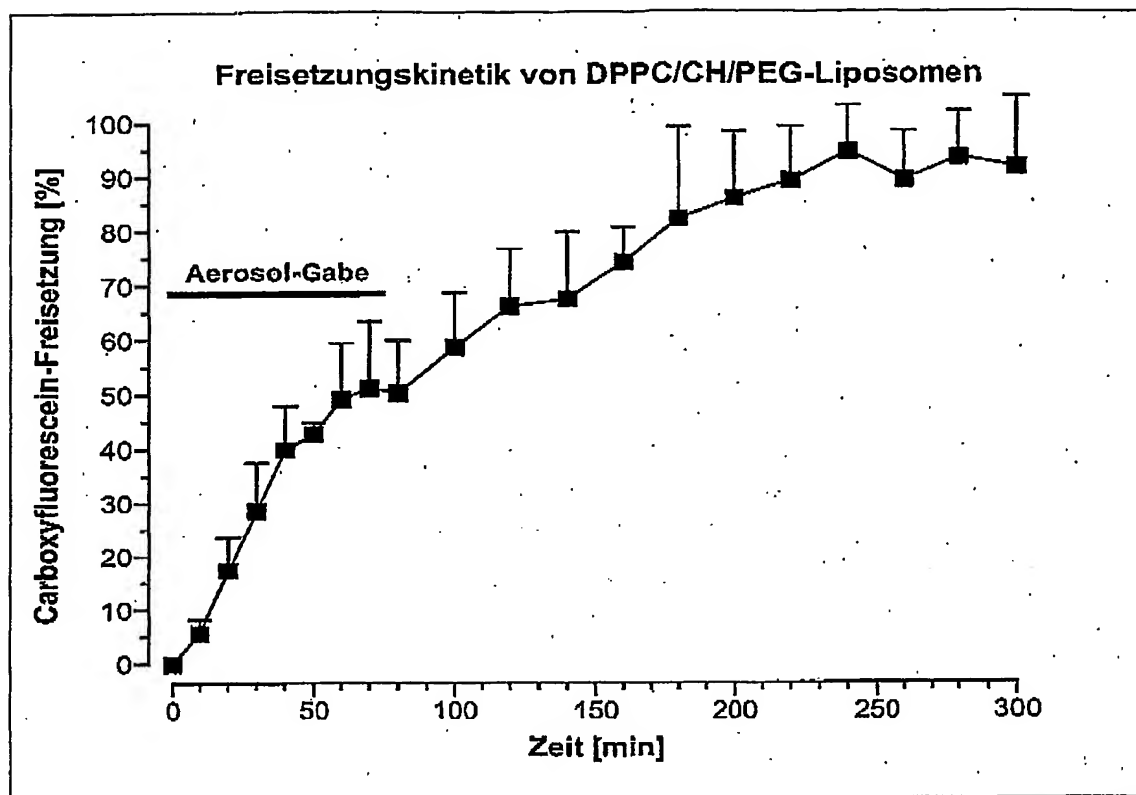
10

15

An.119/Wa/Ges/Schm

27/28

Abb. 3



5

10

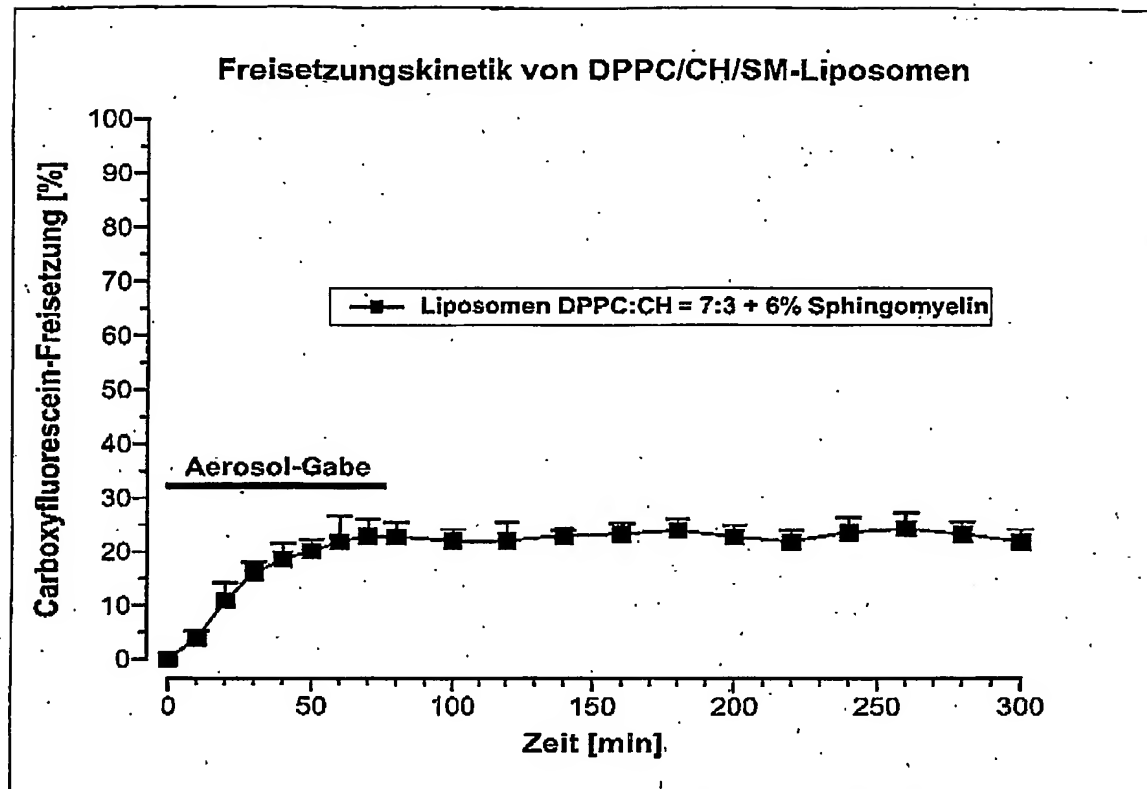
15

An.119/Wa/Ges/Schm

28/28

32

Abb. 4



5

An. 119/Wa/Ges/Schm

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**